

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

APLIKASI VAKSIN BIVALEN (VNN DAN GSDIV) PADA PEMELIHARAAN LARVA IKAN KERAPU SUNU, *Plectropomus leopardus*

Ketut Mahardika[#], Indah Mastuti, Sudewi, Yasmina Nirmala Asih, Ahmad Muzaki, dan I Nyoman Adiasmara Giri

Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan
Jl. Br. Gondol Kec. Gerokgak Kab. Buleleng, Kotak Pos 140, Singaraja 81101, Bali

(Naskah diterima: 6 Maret 2018; Revisi final: 10 Desember 2018; Disetujui publikasi: 10 Desember 2018)

ABSTRAK

Beta-nodavirus sebagai agen penyebab VNN (virus nervous necrosis) dan infeksi GSDIV (grouper sleepy disease iridovirus, isolat dari genus *Megalocytivirus*) merupakan penyakit yang menyebabkan mortalitas yang tinggi pada larva dan juvenil ikan kerapu dan kakap di Indonesia. Pencegahan infeksi virus tersebut menjadi prioritas utama dalam budidaya ikan tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas vaksin bivalen dalam mencegah infeksi virus VNN dan GSDIV pada pemeliharaan larva ikan kerapu sunu, *Plectropomus leopardus*. Sebanyak 5 mL vaksin bivalen (kombinasi antara vaksin protein rekombinan VNN dan GSDIV dengan rasio 1:1 v/v) di bio-enkapsulasi ke dalam 30 liter pakan alami *Rotifera* dan *Artemia* (2×10^4 individu/mL). Aplikasi vaksin pada larva ikan kerapu sunu dilakukan melalui pakan alami *Rotifera* dari umur 5-24 hari dan *Artemia* dari umur 25-50 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksin bivalen tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan dan sintasan larva kerapu sunu (panjang: 1,8-2,2 cm dan sintasan: 1,05%-4,07%). Hasil uji tantang dengan VNN dan GSDIV menunjukkan bahwa vaksin tersebut dapat menginduksi gen imunitas larva (MHC-I).

KATA KUNCI: kerapu sunu; *Megalocytivirus*; VNN; vaksin bivalen

ABSTRACT: *Effectiveness of bivalent vaccine (protein recombinant VNN and GSDIV) to prevent VNN and GSDIV infections in seed of coral trout grouper, Plectropomus leopardus. By: Ketut Mahardika, Indah Mastuti, Sudewi, Yasmina Nirmala Asih, Ahmad Muzaki, and I Nyoman Adiasmara Giri*

Beta-nodavirus as the causative agent of VNN (viral nervous necrosis) and GSDIV infection (grouper sleepy disease iridovirus, isolate from the genus Megalocytivirus) has caused high mortality of cultured grouper and sea bass larvae and juvenile in Indonesia. The prevention of this virus infection on grouper and sea bass culture has become one of the national priority. The purpose of this research was to study the effectiveness of the bivalent vaccine in preventing VNN and GSDIV infections to seed of coral trout grouper, Plectropomus leopardus reared in hatchery. Applications of bivalent vaccine (a combination of protein recombinant VNN and GSDIV vaccine with a ratio of 1:1 v/v) were done by bio-encapsulation using the fish natural diet, Rotifera and Artemia, with a dose of 5 mL vaccine in 30 liters of natural diet (2×10^4 ind./mL). Vaccines were given once a day from the larval age of 5-24 days after hatching using Rotifera and 25-50 day after hatching using Artemia. The results showed that the bivalent vaccine did not influence the growth and survival rate of coral trout grouper larvae (ranged of total length: 1.8-2.2 cm and survival rate: 1.05%-4.07%). The challenge test with VNN and GSDIV revealed that the vaccine had positively induced gene related immunity of larvae MHC-I.

KEYWORDS: coral trout grouper; *Megalocytivirus*; VNN; bivalent vaccine

PENDAHULUAN

Perikanan budidaya laut mengalami kemajuan yang sangat pesat di Asia. Budidaya menjadi minat utama bagi praktisi perikanan semenjak terjadinya penurunan

hasil tangkapan dari laut. Perkembangan budidaya yang semakin meningkat menyebabkan banyaknya usaha perbenihan maupun pembesaran yang tidak memperhatikan daya dukung lingkungan. Hal ini dapat berakibat buruk pada lingkungan sekitarnya, seperti limbah budidaya yang dibuang secara langsung ke laut dapat memengaruhi kelangsungan hidup biota laut dan menimbulkan pencemaran lingkungan. Pencemaran lingkungan menjadi salah satu penyebab suburnya

[#] Korespondensi: Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan. Jl. Br. Gondol Kec. Gerokgak Kab. Buleleng, Kotak Pos 140, Singaraja, Bali 88180, Indonesia. Tel. + 62 362 92272
E-mail: kmahardika@yahoo.com

mikroorganisme patogen. Seperti kejadian kematian ikan akibat infeksi beta-nodavirus (penyebab penyakit VNN/*viral nervous necrosis*) dan infeksi virus dari genus *Megalocytivirus* (*grouper sleepy disease* iridovirus/ GSDIV) pada perbenihan ikan kerapu dan kakap. Pemutusan siklus hidup dari virus ini di perairan sudah tidak memungkinkan lagi untuk dilakukan. Beberapa ikan liar, plankton, dan krustasea kecil disinyalir dapat menjadi inang perantara bagi virus ini di samping faktor cuaca, lingkungan, dan stres yang membuat kondisi ikan lemah atau rentan terhadap infeksi penyakit (Cherif & Fatma, 2017; Yahunar *et al.*, 2016).

Pencegahan infeksi virus tersebut menjadi salah satu upaya alternatif yang diawali dengan melakukan inventarisasi penyakit dan penyediaan vaksin yang mempunyai efektivitas yang baik dalam pencegahan infeksi penyakit virus pada ikan laut dan dapat diproduksi secara komersial di Indonesia. Vaksin komersial untuk budidaya ikan laut sebagian besar masih diimpor dari luar negeri. Vaksin virus isolat lokal masih belum banyak diperoleh di pasaran. Vaksin yang tersedia merupakan produk rekayasa genetik seperti DNA vaksin dan protein rekombinan. Penggunaan vaksin rekombinan dalam budidaya ikan masih menimbulkan pro dan kontra karena disinyalir dapat menimbulkan residu pada manusia setelah mengonsumsi ikan tersebut. Namun demikian, pemilihan vaksin rekombinan menjadi usaha alternatif karena vaksin inaktif dari perbanyakan virus secara *invitro* sangat sulit, tidak stabil, dan biaya pemeliharaan isolat virus yang mahal. Vaksin rekombinan merupakan hasil penyisipan gen virus ke dalam vektor yang diekspresikan ke dalam sel bakteri kompeten. Biaya untuk proses kloning memang mahal, namun selanjutnya biaya produksi menjadi murah karena pemeliharaan dan perbanyakannya dengan mengkultur sel bakteri pembawa gen rekombinan dapat dilakukan secara kontinu.

Aplikasi inaktif vaksin VNN pada larva ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* melalui perendaman dan juvenil ikan *Atlantic halibut*, *Hippoglossus hippoglossus*, dan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* melalui injeksi intramuskular telah dilakukan dan mampu menekan kematian larva dan juvenil setelah dilakukan uji tantang dengan virus VNN (Kai & Chi, 2008; Sommerset *et al.*, 2005; Mahardika *et al.*, 2002). Vaksin rekombinan kapsid protein *striped jack* VNN (salah satu isolat dari piscine *Nodavirus*) juga dilaporkan mampu meningkatkan level dari spesifik antibodi-rT2 selama 20 hari pasca-vaksinasi (Husgaro *et al.*, 2001). Vaksin rekombinan VNN dilaporkan efektif meningkatkan imunitas larva kerapu lumpur dengan RPS: 64,2%-69,5% setelah diuji tantang dengan virus VNN (Lin *et al.*,

2007). Rekombinan vaksin kapsid protein VNN isolat dari Indonesia juga telah diuji secara laboratorium dan dikembangkan, serta dilaporkan mampu mencegah kematian massal ikan kerapu bebek terhadap infeksi VNN (Mahardika *et al.*, 2016b; Murwantoko *et al.*, 2008).

Vaksin protein rekombinan dari dinding sel maupun MCP (major capsid protein) virus GSDIV juga telah berhasil diaplikasikan secara laboratorium. Vaksin tersebut mampu meningkatkan daya tahan tubuh ikan kerapu bebek terhadap infeksi virus GSDIV yang ditunjukkan dari nilai RPS (*relative percentage survival*) yang diperoleh yaitu 40%-58% tanpa *adjuvant* dan 50%-70% dengan penambahan *adjuvant* (Mahardika & Mastuti, 2015; Mahardika *et al.*, 2016a). Aplikasi vaksin rekombinan GSDIV yang dikombinasikan dengan vaksin polivalen *Vibrio* sp. mampu meningkatkan titer antibodi dan nilai RPS ikan kerapu macan, *E. fuscoguttatus* sampai 84% setelah di uji tantang dengan virus GSDIV (tiga bulan pasca-vaksinasi) (Zafran, 2016).

Penerapan vaksin-vaksin tersebut pada stadia awal ikan yang dibudidayakan di unit pembenihan (*hatchery*) dipandang perlu untuk meningkatkan ketahanan ikan sebelum ditebar di tambak maupun keramba jaring apung. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas vaksin bivalen (kombinasi antara vaksin protein rekombinan VNN dan GSDIV) dalam mencegah infeksi virus VNN dan GSDIV pada pemeliharaan larva ikan kerapu sunu.

BAHAN DAN METODE

Perbanyakan dan Inaktivasi Sel Bakteri *Escherichia coli* strain BL-21 Pembawa Protein Rekombinan RNA2-VNN dan MCP-GSDIV.

Bakteri *E. coli* BL-21 yang pembawa protein rekombinan RNA2-VNN dan MCP-GSDIV masing-masing dikultur dalam 500 mL media LB yang mengandung kanamycin hingga mencapai nilai OD (*optical density*) 1 (satu) pada panjang gelombang 600 nm. Kemudian kedua kultur *E. coli* BL-21 tersebut diinduksi dengan 0,1 mM IPTG agar protein rekombinan terproduksi. Adanya produksi protein pada BL-21 dikonfirmasi dengan analisis SDS-page mengikuti metode yang telah dilakukan sebelumnya oleh Mahardika & Mastuti (2015).

Inaktivasi *E. coli* BL-21 yang telah diketahui menghasilkan protein rekombinan dilakukan dengan menambahkan formalin hingga konsentrasi akhir adalah 0,03% selama satu malam pada suhu ruang. Formalin dibersihkan dengan sentrifugasi 6.000 rpm selama lima menit. Pelet yang dihasilkan diencerkan kembali hingga kepadatan *E. coli* BL-21 ekuivalen

dengan kepadatan (10^8 CFU/mL). Kedua vaksin (VNN dan GSDIV) dicampur menjadi satu dengan perbandingan 1:1 v/v (vaksin bivalen).

Aplikasi Vaksin Bivalen pada Pemeliharaan Larva Kerapu Sunu

Aplikasi vaksin bivalen pada pemeliharaan larva kerapu dilakukan melalui pakan alami dengan mengikuti metode yang sebelumnya dilaporkan oleh Lin *et al.* (2007). Pakan alami yang digunakan yaitu *Rotifera* dan *Artemia*. Sebanyak 5 mL vaksin bivalen diberikan pada 30 L kultur *Rotifera* atau *Artemia* (2×10^4 individu/mL) bersama-sama dengan bahan pengkaya yaitu 6,0 g algamac®; 3,9 g vitamin C; dan 0,075 g taurin. Pemberian vaksin bivalen dan bahan pengkaya pada kultur *Rotifera/Artemia* dilakukan empat jam sebelum digunakan. Pemberian vaksin bivalen melalui *Rotifera* pada umur 5 HSM hingga 24 HSM, sedangkan pemberian vaksin melalui *Artemia* dimulai pada umur 25 HSM hingga 50 HSM (saat *grading*).

Sebagai kontrol, dilakukan pula pemeliharaan larva kerapu sunu dengan metode yang sama tanpa pemberian vaksin bivalen. Pemeliharaan larva dengan perlakuan vaksin dan non-vaksin tersebut dilakukan dalam tiga kali percobaan dengan waktu yang berbeda yaitu bulan Januari, Februari, dan Agustus. Setiap perlakuan terdiri atas dua ulangan bak. Sintasan juvenil ikan kerapu sunu umur 50 hari dari perlakuan tersebut dianalisis dengan RAK (rancangan acak kelompok).

Pemeliharaan Larva Kerapu Sunu

Pemeliharaan larva kerapu sunu mengikuti prosedur pembenihan yang sebelumnya telah dilaporkan oleh Aslianti *et al.* (2008) dengan beberapa modifikasi. Manajemen pemberian pakan dan pergantian air dilakukan seperti disajikan pada Tabel 1. Secara ringkas, larva dipelihara menggunakan bak beton warna kuning dengan kapasitas 6.000 L. Bak dilengkapi dengan plastik transparan sebagai penutup untuk menjaga suhu lebih stabil. Intensitas cahaya berkisar antara 1.000-1.200 lux pada permukaan air. Air yang digunakan adalah air yang telah ditampung dalam bak di *hatchery* untuk aklimatisasi suhu dan telah disterilisasi dengan lampu UV selama 4-5 jam.

Deteksi Immunitas Larva Kerapu Sunu dengan PCR

Isolasi total RNA benih ikan kerapu sunu

Langkah awal dalam deteksi respons imunitas menggunakan PCR adalah mengisolasi total RNA dari larva kerapu sunu umur yang berbeda, yaitu dari umur 5 HSM hingga 50 HSM dengan interval waktu selama

lima hari (vaksinasi dan tanpa vaksinasi). Sebanyak 350-400 μ g larva diekstraksi menggunakan Trizol® LS (Invitrogen) sesuai protokol.

Sintesis cDNA dari RNA benih ikan kerapu sunu

Genom RNA disintesis menjadi cDNA dengan kit *reverse transcription system* (Promega) sesuai protokol. Sampel diinkubasi pada suhu 70°C selama lima menit, dilanjutkan pada suhu 42°C selama 60 menit. Reaksi dihentikan dengan pemanasan selama lima menit pada suhu 95°C. Sampel cDNA disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Deteksi respons imunitas pada benih ikan kerapu

Deteksi ada tidaknya respons imunitas larva kerapu oleh perlakuan (aplikasi kombinasi vaksin rekombinan VNN dan GSDIV, dan tanpa vaksinasi), dianalisis menggunakan PCR dengan primer reseptor MHC-I dari *red seabream* (Gen Bank no. AY190713), dan antigen MHC-II (Gen Bank no. AY190712) mengikuti prosedur yang sebelumnya dilaporkan oleh Caipang *et al.* (2006). β -actin (Gen Bank no. AY190686) digunakan sebagai internal kontrol pada semua sampel yang dideteksi. Dua mikroliter sampel cDNA digunakan untuk PCR dalam reaksi 25 mL. Siklus suhu dan waktu amplifikasi PCR adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada 95°C untuk tiga menit, diikuti 30 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik, dan perpanjangan pada 72°C selama satu menit, dan tahap perpanjangan terakhir pada suhu 72°C selama lima menit. Produk PCR (5 μ L) divisualisasikan pada 1,5% gel agarose yang diwarnai dengan etidium bromide, diamati dengan UV transilluminator dan didokumentasikan dengan kamera gel.

Pengukuran Efektivitas Vaksinasi pada Larva Kerapu Sunu

Efektivitas aplikasi vaksin bivalen pada larva kerapu sunu dilakukan hanya pada percobaan ketiga yaitu melalui uji tantang dengan isolat virus VNN dan GSDIV. Uji tantang dengan kedua virus tersebut dilakukan pada benih umur 50 HSM dan dilakukan secara terpisah melalui perendaman pada masing-masing 50 ekor benih kerapu yang divaksin maupun tidak divaksin (kontrol). Setelah diinfeksi dengan virus VNN dan GSDIV (perendaman selama dua jam dengan 5 mL virus/50 L air laut), masing-masing 10 benih dipisahkan dan ditempatkan dalam 100 L bak plastik yang berbeda (masing-masing perlakuan diulang sebanyak lima kali). Analisis data sintasan setelah uji tantang virus dilakukan dengan menggunakan *One Way Anova* dengan program *R Commander* versi R.3.3.2 for Windows.

Tabel 1. Skema pemberian pakan alami dan buatan, serta sistem pergantian air selama pemeliharaan larva kerapu sunu

Table 1. Schematic representation of natural feed, artificial feed, and water changes management in reared coral trout larvae

	Hari setelah penetasan (Day after hatching)																
	2	3	5	7	9	10	11	12	13	14	16	17	20	25	30	40	50
Manajemen pakan (Feed management)																	
Plankton (<i>Nannochloropsis oculata</i>)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Minyak ikan (<i>Fish oil</i>)	*	*	*														
Rotifera (<i>Brachionus</i> sp.)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nauplii kopepod (<i>Nauplii of copepod</i>)	*	*															
Pakan buatan (<i>Artificial diet</i>)								*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Artemia</i> (<i>Nauplii of Artemia</i>)													*	*	*	*	*
Manajemen air (Water management)																	
Ganti air 5%-10% (<i>Water changes 5%-10%</i>)							*	*									
Ganti air 10%-25% (<i>Water changes 10%-25%</i>)									*	*	*	*					
Ganti air $\geq 25\%$ (<i>Water changes $\geq 25\%$</i>)													*	*	*	*	*
Gradual air 100% (<i>Gradual till 100%</i>)																	
Sipon (<i>Siphon</i>)									*	*	*	*	*	*	*	*	*

Pengukuran Kualitas Air dan Populasi Bakteri

Kualitas air meliputi suhu, pH, amoniam, dan nitrit, serta populasi bakteri air dan larva diukur setiap 10 hari sampai umur 50 HSM.

HASIL DAN BAHASAN

Perkembangan dan Sintasan Larva

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian vaksin bivalen dalam pemeliharaan larva kerapu sunu tidak berpengaruh ($P > 0,05$) terhadap sintasan selama 50 hari pemeliharaan (Tabel 2). Hasil pemeliharaan larva kerapu sunu selama penelitian ini sejalan dengan

hasil penelitian yang dilaporkan sebelumnya oleh Suwirya & Giri (2010) yang menyatakan bahwa pemeliharaan larva kerapu sunu selama 45-55 hari menghasilkan benih dengan ukuran panjang 2-3 cm, dengan sintasan berkisar antara 0,5%-3,0%. Lebih lanjut dilaporkan bahwa kendala utama yang dihadapi dalam pemeliharaan larva adalah ukuran bukaan mulut yang relatif lebih kecil dibandingkan dengan larva ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* dan kerapu macan, *E. fuscoguttatus*. Pemberian pakan alami sebagai pakan awal pada pemeliharaan larva kerapu sunu harus diberikan lebih dini. Kurang sesuaianya sediaan pakan alami dengan perkembangan larva baik dari segi

Tabel 2. Sintasan larva kerapu sunu *P. leopardus* yang diberi vaksin bivalen melalui pakan alami selama 50 hari pemeliharaan

Table 2. Survival rate of coral trout grouper *P. leopardus* larvae with bivalent vaccine through natural feed for 50 days rearing

Percobaan Trial	Perlakuan (Treatments)	
	Vaksin (Vaccine)	Tanpa vaksin (Non Vaccine)
1	4.07	3.17
2	1.53	1.49
3	1.05	1.60
Rata-rata (Mean)	2.22 ^a	2.09 ^a

Keterangan : Huruf yang sama dalam baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$)

Description : The same letters in the same row show no significant difference ($P > 0.05$)

ukuran, jenis, maupun kandungan nutrisi, juga merupakan penyebab utama kematian larva secara massal (Melianawati *et al.*, 2006).

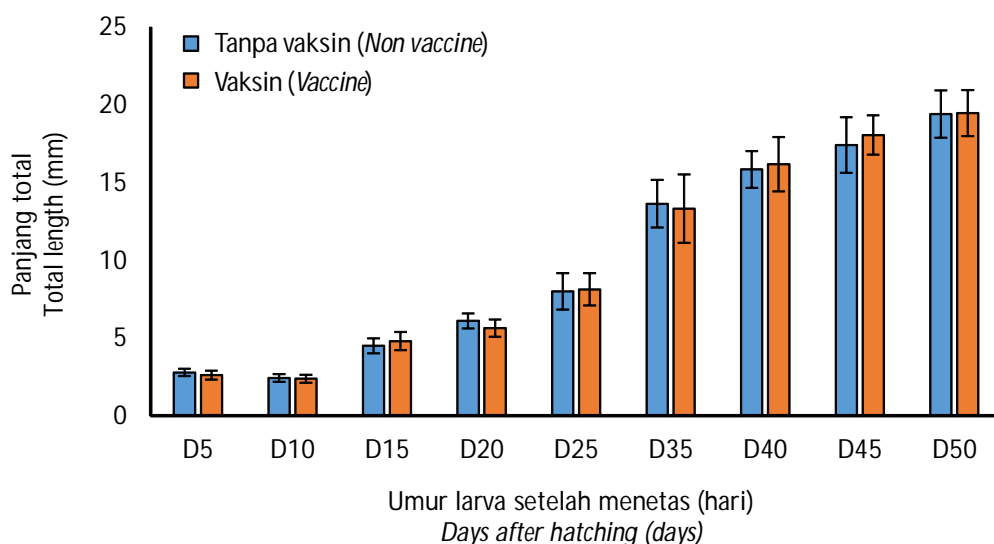
Larva kerapu sunu dengan pemberian vaksin bivalen maupun tanpa pemberian vaksin menunjukkan pertumbuhan panjang yang sama selama 50 hari pemeliharaan (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa vaksin bivalen tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan panjang larva kerapu sunu.

Deteksi Respons Imun Gen pada Ikan yang Diberikan Vaksin

Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa larva kerapu sunu yang diberi vaksin bivalen mampu menginduksi gen MHC-I, namun tidak menunjukkan adanya induksi gen MHC-II. Hal sebaliknya terjadi pada larva kerapu sunu yang tidak diberi vaksin menunjukkan tidak adanya induksi gen MHC-I (Gambar 2). Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan sebelumnya oleh Kai *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa benih ikan kerapu lumpur, *E. coioides* umur 40 HSM yang diberi inaktif vaksin VNN melalui pakan *Artemia* mampu meningkatkan ekspresi MHC-I. Menurut Caipang *et al.* (2006), inaktif vaksin RSIV (red sea bream iridovirus) yang diberikan pada ikan kakap (red sea bream) ukuran 3-7 g mampu meningkatkan ekspresi MHC-I walaupun tingkat ekspresinya bervariasi. Ekspresi MHC-I diregulasi dalam ikan yang divaksinasi walaupun vaksin yang diberikan dianggap sebagai antigen eksogen. MHC-I pada ikan yang

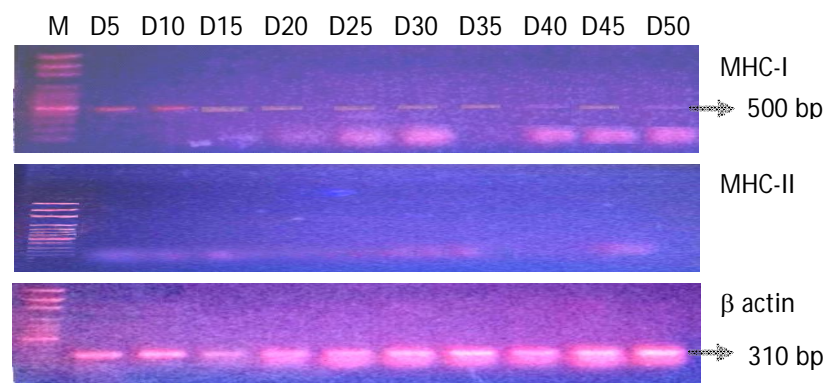
divaksinasi mungkin merupakan hasil asosiasi antigen eksogen ke beberapa struktur yang pada akhirnya tertranslokasi ke dalam sitoplasma. Dengan demikian, antigen yang terlokasi pada sitoplasma dapat berlaku sebagai peptida endogen dan disintesis oleh molekul MHC-I. Dengan meningkatnya induksi pada gen MHC-I diduga berkaitan dengan respons imunitas sel pada larva-benih ikan untuk melawan infeksi virus.

Gen MHC-II terdeteksi pada awal perkembangan larva yang tidak diberi vaksin (5 dan 10 HSM). Larva ikan pada awal perkembangannya sangat rentan terhadap penyakit karena hanya mengandalkan sistem kekebalan maternal sedangkan sistem imun adaptif masih berkembang (Magnadottir, 2006). Menurut Wedekind *et al.* (2004), terdapat hubungan antara kerentanan ikan *Coregonus* sp. terhadap infeksi bakteri *Pseudomonas fluorescens* dengan induksi MHC-II dari imunitas maternal dan paternal. Demikian pula Uribe *et al.* (2011) menyatakan bahwa benih ikan *teleost* menunjukkan respons yang kuat terhadap infeksi bakteri, dengan aktivasi aktif imunitas spesifik humoral (MHC-II/CD4+) beserta sel fagositik, dan peptida antimikroba. Hal yang sama mungkin terjadi pada stadia awal perkembangan larva kerapu sunu. Pada larva kerapu sunu yang diberi vaksin tidak terpengaruh dengan adanya bakteri karena vaksin yang diberikan merupakan vaksin protein rekombinan yang disisipkan dalam sel bakteri *E. coli* (Mahardika & Mastuti, 2015). *Escherichia coli* BL-21 pembawa protein rekombinan VNN/GSDIV mungkin direspons sekaligus oleh sel T

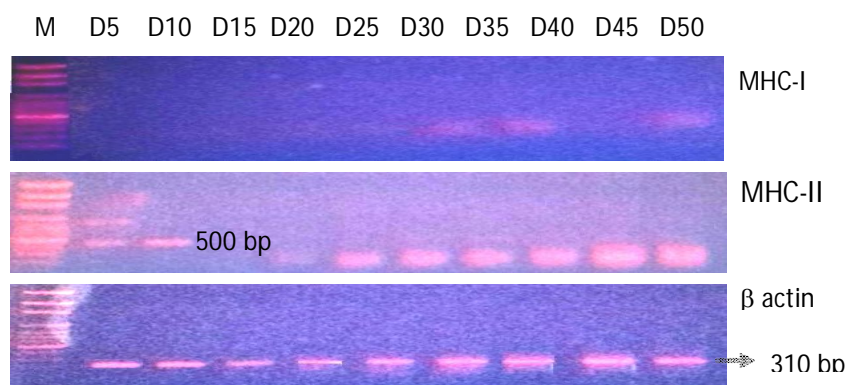


Gambar 1. Panjang total larva kerapu sunu *P. leopardus* dengan pemberian vaksin bivalen melalui pakan alami selama 50 hari pemeliharaan pada percobaan ke-III (n= 20 ekor).

Figure 1. Total length of coral trout grouper *P. leopardus* larvae treated with bivalent vaccine through natural feed for 50 days observation in third trial (n= 20 fish).



A. Vaksin (Vaccine)



B. Tanpa vaksin (Non vaccine)

Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR pada larva kerapu sunu *P. leopardus* yang diberi vaksin (A) dan tidak diberi vaksin (B) pada umur 5-50 hari setelah menetas (HSM), menggunakan primer MHC-I, MHC-II, dan b-actin. M= marker 100 bp; D5-D50= umur larva 5-50 HSM.

Figure 2. The results of PCR amplification on coral trout grouper, *P. leopardus* larvae: vaccinated (A) and without vaccinated (B) on day-5 to day-50 days after hatching, using MHC-I, MHC-II, and β -actin primers. M= 100 bp DNA ladder marker.

sitotoksik sehingga hanya ekspresi MHC-I saja yang terdeteksi pada ikan yang diberi vaksin.

Aplikasi vaksin rekombinan protein melalui pakan alami *Artemia* juga dilaporkan telah dilakukan pada larva kerapu lumpur, *E. coioides* (Lin *et al.*, 2007). Nauplii *Artemia* yang diberi vaksin rekombinan dan diinkubasi selama tiga jam sebelum diberikan ke larva, secara imunohistokimia dilaporkan mampu membawa vaksin tersebut dalam tubuhnya. Lebih lanjut dilaporkan bahwa antigen VNN NP masuk dan diserap dalam usus larva untuk selanjutnya menginduksi anti-VNN VP spesifik antibodi setelah tujuh hari pemberian. Larva yang divaksinasi menunjukkan tingkat proteksi yang lebih tinggi (RPS: 64,2% dan 69,5%) setelah diuji tantang dengan virus VNN. Analisis PCR dengan primer F-2 dan R-3 (Novriadi *et al.*, 2015) terhadap infeksi virus VNN pada larva kerapu sunu umur 5-50 HSM pada kelompok vaksin maupun kontrol tidak

menunjukkan adanya kontaminasi ataupun infeksi virus VNN, dan pada gel agarosa tidak terlihat garis/pita sesuai target (570 bp).

Efektivitas Vaksinasi pada Larva Kerapu Sunu

Hasil uji tantang dengan virus VNN dan GSDIV menunjukkan bahwa pada perlakuan aplikasi vaksin bivalen pada larva kerapu sunu melalui pakan alami *Rotifera* dan *Artemia* mampu menunjukkan sintasan yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan larva yang tidak diberi vaksin (Tabel 3). Namun, sintasan yang diperoleh dalam uji tantang ini masih rendah ($< 50\%$). Hal tersebut disebabkan benih kerapu sunu ukuran 1,5-2,5 cm (50 HSM) masih sensitif dan cepat stres, pada saat dipindahkan ke dalam wadah uji, akibat adanya perbedaan lingkungan pemeliharaan dan penanganan yang tidak nyaman bagi benih. Apalagi dalam hal uji tantang virus yang dilakukan dalam ruang

tersendiri dalam bak tanpa air mengalir, sehingga seringkali kualitas air menjadi faktor pembatas. Hal ini seperti dilaporkan oleh Suwiry & Giri (2010) bahwa larva kerapu sunu relatif lebih sensitif terhadap guncangan kondisi lingkungan sehingga diperlukan penanganan yang lebih hati-hati. Namun demikian, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pemberian vaksin protein rekombinan VNN dan GSDIV benih ikan kerapu sunu mampu bertahan hidup dengan adanya infeksi virus VNN dan GSDIV.

Vaksin inaktif *E. coli* BL-21 pembawa protein rekombinan telah digunakan untuk mengimunisasi beberapa spesies ikan untuk pencegahan terhadap infeksi VNN. Rekombinan protein (rT2) dari SJNNV (stripped jack nervous necrosis virus) dilaporkan mampu meningkatkan proteksi juvenil ikan turbot, *Scophthalmus maximus* setelah terpapar oleh SJNNV, walaupun kematian ikan pada kelompok kontrol rendah. Vaksin tersebut juga mampu menginduksi antibodi spesifik pada ikan turbot dewasa dan ikan *Atlantic halibut*, *Hippoglossus hippoglossus* (Husgaro *et al.*, 2001; Sommerset *et al.*, 2005). Peningkatan titer antibodi dan sintasan juga ditunjukkan oleh ikan *European sea bass*, *Dicentrarchus labrax* yang diberi vaksin rekombinan baculovirus yang mengekspresikan virus-like partikel (VLPs) dari betanodavirus MGNNV (malabaricus grouper nervous necrosis virus) (Thie'ry *et al.*, 2006). Demikian pula dengan vaksin inaktif *E. coli* pembawa protein rekombinan dinding virus (capsid) RSIV (351R), 18R, dan MCP (mayor capsid protein) mampu meningkatkan daya tahan ikan kakap merah (red sea bream/*Pagrus major*) dan kerapu bebek terhadap infeksi iridovirus (Shimmoto *et al.*, 2010; Mahardika & Mastuti, 2015).

Kualitas Air dan Populasi Bakteri

Hasil pengamatan suhu pada pagi hari pukul 8:00-9:00 berkisar antara 29°C-29,5°C; sedangkan pada sore hari pukul 3:00-4:00 berkisar antara 29°C-30°C (Tabel 4). pH air pemeliharaan larva dari kedua perlakuan memperlihatkan kisaran nilai yang sama yaitu 8-8,5.

Nilai nitrit berada di bawah 10 mg/L pada air pemeliharaan larva di 20 hari pertama, namun terjadi sedikit peningkatan sampai hari ke-30. Kadar amonium meningkat sampai 10 hari pemeliharaan larva yang disebabkan belum adanya pergantian air sedangkan pemberian plankton sebagai peneduh dan pakan alami setiap hari mungkin ikut berperan dalam peningkatan kadar amonium dalam air. Nilai amonium mulai menurun setelah dilakukan pergantian air secara perlahan. Nilai *dissolve oxygen* (DO) selama pemeliharaan larva masih dalam kisaran normal. Menurut Ismi (2014), lingkungan pemeliharaan larva harus dijaga dengan baik di musim penghujan maupun musim kemarau. Kondisi lingkungan pemeliharaan larva yang harus dijaga kestabilannya terutama suhu berkisar antara 28°C-30°C, pH berkisar 8, salinitas antara 32-34 ppt, dan DO berkisar antara 4,5-6 mg/L. Tingginya kadar amonium dalam air dapat diturunkan melalui pergantian air dengan memperhitungkan umur larva (>9 HSM).

Hasil isolasi total bakteri dalam air pemeliharaan larva kerapu sunu yang diberi vaksin maupun tidak diberi vaksin (kontrol) menunjukkan hasil yang sama. Demikian pula dengan total *Vibrio* sp. memiliki nilai yang sama di kedua perlakuan (Tabel 4). Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian vaksin tidak memengaruhi populasi bakteri dalam air. Vaksin berhubungan langsung terhadap imunitas larva kerapu sunu seperti yang diterangkan sebelumnya. Peningkatan total bakteri terjadi di awal pemeliharaan larva (10 hari) yaitu berkisar antara $3,3 \times 10^4$ - $3,2 \times 10^5$ CFU/mL. Populasi bakteri menurun setelah pergantian air, namun meningkat kembali seiring dengan peningkatan umur larva. Populasi bakteri pada air pemeliharaan larva juga dilaporkan berkisar antara $1,1 \pm 0,6 \times 10^4$ - $9,8 \pm 0,5 \times 10^6$ CFU/mL. Populasi bakteri pada telur adalah $2,4 \pm 0,4 \times 10^5$ - $8,6 \pm 1,6 \times 10^6$ CFU/mL, dan pada larva adalah $2,5 \pm 1,4 \times 10^4$ - $1,6 \pm 1,0 \times 10^8$ CFU/mL (Phatapekar *et al.*, 2002). Bakteri tersebut didominasi oleh bakteri gram negatif.

Tabel 3. Sintasan benih kerapu sunu *L. leopardus* setelah di uji tantang dengan virus VNN dan GSDIV melalui perendaman selama 10 hari pengamatan

Table 3. Survival rate of coral trout grouper *L. leopardus* fry after challenged with VNN and GSDIV for 10 days observation

Perlakuan <i>Treatments</i>	Sintasan larva (<i>Larval survival rate</i>) (%)	
	Setelah uji tantang dengan inokulum VNN <i>After challenged with VNN</i>	Setelah uji tantang dengan inokulum GSDIV <i>After challenged with GSDIV</i>
Tanpa vaksin (<i>Non vaccine</i>)	18 ± 1.52^a	22 ± 1.67^a
Vaksin (<i>Vaccine</i>)	28 ± 0.89^b	35 ± 1.0^b

Tabel 4. Nilai kualitas air dan populasi bakteri air selama 50 hari pemeliharaan larva kerapu suhu di hatchery
 Table 4. The water quality value and bacterial population in the larval rearing of coral trout grouper in hatchery for 50 days

Parameter uji Parameter	Perlakuan Treatments	Hasil pengamatan per 10 hari (Result among 10 days observation)				
		~ 10	~ 20	~ 30	~ 40	~ 50
Suhu air pagi Water temperature in the morning (°C)	Vaksin (Vaccine)	29-29.5	29.3-29.5	29-29.5	29-29.5	29-29.5
	Tanpa vaksin Non vaccine	29-29.5	29-29.5	29-29.5	29-29.5	29-29.5
Suhu air sore Water temperature in the afternoon (°C)	Vaksin (Vaccine)	29.3-30	29.5-30	29.3-30	29.5-30	29.5-30
	Tanpa vaksin Non vaccine	29.5-30	29.5-30	29-30	29.5-30	29.5-30
pH	Vaksin (Vaccine)	8.3-8.5	8-8.5	8.2-8.5	8.3-8.5	8.5
	Tanpa vaksin Non vaccine	8.2-8.5	8-8.5	8.2-8.5	8.3-8.5	8.5
Nitrit (Nitrite) (NO ₂ : mg/L)	Vaksin (Vaccine)	0-0.5	0-0.8	0.5-1.8	0.5	0.5
	Tanpa vaksin Non vaccine	0-0.5	0-0.6	0.7-1.8	0.7-0.8	0.5
Amonium (Ammonium) (NH ₄ : mg/L)	Vaksin (Vaccine)	0-1	0.5-1.2	0.4-0.8	0.3-0.4	0.4
	Tanpa vaksin Non vaccine	0-1	0.7-1.3	0.3-0.7	0.3	0.4
Oksigen terlarut Dissolved oxygen /DO (mg/L)	Vaksin (Vaccine)	6-6.2	5.6-6.1	4.8-5.6	5.6-6	6.2
	Tanpa vaksin Non vaccine	6-6.2	5.6-.2	4.6-5.6	5.6-6	6.2
Total bakteri air Total bacteri in the water (CFU/mL)	Vaksin (Vaccine)	3.3x10 ⁴ -3.2x10 ⁵	2-3x10 ⁴	1.8-5.6x10 ⁴	6x10 ⁴ -4.4x10 ⁵	4.5-7.4x10 ⁵
	Tanpa vaksin Non vaccine	6.7x10 ⁴ -2.3x10 ⁵	1-2.8x10 ⁴	1.9-4.7x10 ⁴	3x10 ⁴ -6.7x10 ⁵	4-7.6x10 ⁵
Total <i>Vibrio</i> sp. Total <i>Vibrio</i> sp. in the water (CFU/mL)	Vaksin (Vaccine)	1.2-9x10 ²	2.3x10 ² -3.7x10 ³	1.9-2.5x10 ³	2.4-2.8x10 ³	2.2-4.5x10 ³
	Tanpa vaksin Non vaccine	2.5-8.2x10 ²	2.9x10 ² -2.4x10 ³	2.1-2.3x10 ³	2.3-2.7x10 ³	2.5-4.3x10 ³

KESIMPULAN

Aplikasi vaksin bivalen (kombinasi antara vaksin protein rekombinan VNN dan GSDIV) pada pemeliharaan larva kerapu suhu belum memberikan perbedaan yang nyata pada sintasan dan pertumbuhan. Hasil uji tantang VNN dan GSDIV menunjukkan bahwa vaksinasi mampu menginduksi imunitas non-spesifik pada gen MHC-I larva dan benih kerapu suhu dengan memberikan sintasan yang berbeda.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari APBN dalam DIPA Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan, Gondol tahun 2017. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Sri Suratmi, Bapak Ketut Arya M. Sudewa, Bapak Putu Suarjana, Bapak Gusti Oka Suarjana, Bapak

Made Sulandra, Bapak Karyanto, dan Bapak Dedi Rohaniawan selaku teknisi litkayasa pada hatchery kerapu suhu dan Laboratorium Patologi, BBRBLPP yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini. Terima kasih pula penulis ucapkan atas masukan, saran, dan perbaikan yang diberikan oleh Bapak Prof. Dr. Ketut Sugama.

DAFTAR ACUAN

- Aslianti, T., Suwiry, K., & Asmanik. (2008). Teknologi pemeliharaan larva kerapu suhu (*Plectropomus leopardus*) secara massal. *Jurnal Riset Akuakultur*, 3(1), 1-11.
- Caipang, C.M.A., Takano, T., Hirano, I., & Aoki, T. (2006). Genetic vaccine protect red sea bream iridovirus, *Pagrus major*, upon challenge with red

- sea bream iridovirus (RSIV). *Fish and Shellfish Immunology*, 21, 130-138.
- Cherif, N. & Fatma, A. (2017). Nodavirus in wild fish population collected around aquaculture cage sites from coastal area of Tunisia. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 8(3), 1-6.
- Husgaro, S., Grotmol, S., Hjeltne, B.K., Rodseth, O.M., & Biering, E. (2001). Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis. Aquat. Org.*, 45, 33-44.
- Ismi, S. (2014). Aplikasi teknologi pembenihan kerapu untuk mendukung pengembangan budidaya laut. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 6(1), 109-119.
- Kai, Y-H. & Chi, S-C. (2008). Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine*, 26, 1450-1457.
- Kai, Y-H., Wu, Y-C., & Chi, S-C. (2014). Immune gene expressions in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) induced by bath and oral vaccinations with inactivated betanodavirus. *Fish & Shellfish Immunology*, 40, 563-569.
- Lin, C-C., Lin, J.H-Y., Chen, M-S., & Yang, H-L. (2007). An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 268, 265-273.
- Magnadottir, B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 137-151.
- Mahardika, K., Koesharyani, I., & Tridjoko. (2002). Upaya pencegahan penyakit viral nervous necrosis pada juvenil kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) melalui vaksinasi. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia (Edisi Akuakultur)*, 8(5), 1-7.
- Mahardika, K. & Mastuti, I. (2015). The effects of crude recombinant viral protein vaccine against grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV) on humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). *Indonesian Aquaculture Journal*, 10(2), 163-172.
- Mahardika, K., Mastuti, I., Muzaki, A., & Sudewi. (2016a). Addition of adjuvants in recombinant subunit vaccines for the prevention of grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV) infection in humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Indonesian Aquaculture Journal*, 11(2), 87-95.
- Mahardika, K., Mastuti, I., Sudewi, Muzaki, A., & Zafran (2016b). Uji efektivitas vaksin rekombinan dalam pencegahan infeksi virus pada ikan kerapu. *Laporan Teknis Akhir Kegiatan*, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, Gondol, Bali. hlm. 1-18.
- Melianawati, R., Andamari, R., & Suwirya, K. (2006). Penggunaan kuning telur ayam sebagai alternatif pakan awal bagi larva ikan kerapu sunu (*Plectropomus leopardus*). *J. Aquacultura Indonesiana*, 7(1), 27-35.
- Murwantoko, Widada, J., & Nuraini, Y.L. (2008). Cloning and sequence analysis of coat protein gene of betanodavirus, the causative agent of viral nervous necrosis of grouper. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 13(1), 1048-1054.
- Novriadi, R., Agustatik, S., & Dwi, T.O.N. (2015). Identifikasi keberadaan viral nervous necrosis dan iridovirus pada budidaya ikan laut di wilayah kerja Balai Perikanan Budidaya Laut Batam. *Omni-Akuatika*, 14(20), 54-62.
- Phatapekar, P.V., Kenkre, V.D., Spreepada, R.A., Desai, U.M., & Achuthankutty, C.T. (2002). Bacterial flora associated with larval rearing of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 203, 279-291.
- Sommerset, I., Skern, R., Biering, E., Bleie, H., Fiksdal, I.U., Grove, S., & Nerland, A.H. (2005). Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunology*, 18, 13-29.
- Suwirya, K. & Giri, N.A. (2010). Usaha pengembangan budidaya ikan kerapu sunu, *Plectropomus leopardus* di Indonesia. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur* (hlm. 307-314). Pusat Penelitian dan pengembangan Perikanan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kelautan dan Perikanan.
- Shimmoto, H., Kawai, K., Ikawa, T., & Oshima, S. (2010). Protection of red sea bream *Pagrus major* against red sea bream iridovirus infection by vaccination with a recombinant viral protein. *Microbiology and Immunology*, 54, 135-142.
- Thie´ry, R., Cozien, J., Cabon, J., Lamour, F., Baud, M., & Schneemann, A. (2006). Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *Journal of Virology*, 80(20), 10201-10207.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet. Med.*, 56, 486-503.
- Wedekind, C., Walker, M., Portmann, J., Cenni, B., Mu, R., & Binz, T. (2004). MHC-linked susceptibil-

- ity to a bacterial infection, but no MHC-linked cryptic female choice in whitefish. *J. Evol. Biol.*, 17, 11-18.
- Yahunar, U., Musa, M., Rahayu, D.T., & Arfiati, D. (2016). Identification of plankton on fish pond of *Oreochromis niloticus* infected by viral nervous necrosis. *Research Journal of Life Science*, 03(02), 119-128.
- Zafran. (2016). Efektivitas kombinasi vaksin bakteri polivalen dengan vaksin anti grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV) pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Berita Biologi*, 15(1), 95-100.